SOMMAIRE :

Introduction Page 2

Objectifs du travail Page 4

Méthodologie Page 5

Résultats Page 6

1)- Etude de préformulation

Etude chimique. Page 6

Propriétés physiologiques (Pharmacologie, toxicologie) Page 9

Utilisation Page 10

2)- Recherche d'un tampon pour le test diagnostic de la mucoviscidose Page 15

Description du test

Etudes de substances tampon Page 20

Conclusion Page 23

3)- Recherche d'un tampon pour la solution de glutaraldéhyde Page 23

Utilisation de la solution de glutaraldéhyde(Mode d'emploi et intérêts) Page 23

Farication des solutions de glutaraldéhyde (Choix d'un tampon) Page 24

Farication des solutions de glutaraldéhyde (Problème de la glutaraldéhyde) Page 25

Conclusion Page 27

Annexe 1 : Composition de la solution à base de glutaraldéhyde Page 29

Annexe 2 : Composition des solutions de Kreb's Page 30

Bibliographie Page 31

INTRODUCTION :

Les préparations hospitalières permettent d'adapter la forme des médicaments à leur usage en médecine humaine. Elles permettent également d'obtenir des médicaments avec une qualité propre à assurer la sécurité du patient. Pour leur réalisation, le pharmacien doit utiliser des produits inscrit à la pharmacopée [1], ou le cas échéant établir des contrôles à réaliser pour rendre ces produits pharmaceutiques.

La pharmacie de l'hôpital Necker- Enfants Malades prépare pour le service de chirurgie cardiaque: une solution à base de glutaraldéhyde suite au transfert du service de chirurgie cardiaque de l'hôpital Laennec à l'hôpital Nécker- Enfants malades. La formule utilisée est celle fournie par le service (Annexe 1). La pharmacie a également reçu une demande de faisabilité pour des solutions dite de Kreb's (Annexe 2) par le service d'explorations fonctionnelles.

Ces deux préparations ont en commun de contenir de l'HEPES, substance tampon fabriquée par des laboratoires non pharmaceutiques et ayant le statut de réactif de laboratoire, de ce fait, l'utilisation de l'HEPES dans des préparations destinées à la médecine humaine et animale est interdite [1] à priori.

Les solutions de Kreb's sont utilisées dans le diagnostic de la mucoviscidose, pathologie affectant de nombreux organes, avec un retentissement clinique, surtout pulmonaire. La mucoviscidose est due au dysfonctionnement d'une protéine, la CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator, régulateur transmembranaire de la fibrose kystique) [2, 3]. Cette protéine membranaire a principalement un rôle de canal pour les ions chlorures, mais aussi des fonctions de régulation de canaux ioniques. Son dysfonctionnement se traduit par l'incapacité des membranes cellulaires à sécréter les ions chlorures sur le pôle apical et à absorber les ions sodium [2, 3]. La conséquence physiologique est une insuffisance d'hydratation des secrétions d'où une viscosité accrue, aboutissant à une colonisation bactérienne chronique des poumons avec infections à répétitions provoquant à termes une fibrose et une bronchiectasie [4]. Le diagnostic de la mucoviscidose se fait classiquement par le test à la sueur permettant de mettre en évidence la diminution de la sécrétion des ions chlorures au niveau des secrétions, et par la biologie moléculaire permettant de mettre en évidence la mutation en cause. Le nombre de mutations est proche de 500 [4]. Un troisième

test possible est la mesure de la différence de potentiel trans- épithéliale [5], celle ci étant diminuée en cas de mucoviscidose.

La solution à base de glutaraldéhyde est utilisée depuis les années 80. Elle a été mise au point par l'équipe du Professeur A. Carpentier [6]. Pendant des années, elle était fabriquée par des laboratoires (Exemple : BAXTER), ceux- ci s'en servant pour traiter les péricardes de porcs, afin de fabriquer des bioprothèses valvulaires. Mais la cession aux hôpitaux a été supprimée depuis 4 ans, obligeant les pharmaciens hospitaliers à en assurer la fabrication.

La solution de glutaraldéhyde est utilisée pour traiter les morceaux de péricarde prélevés chez le patient. Ces greffons sont utilisés pour :

1. Réaliser des opérations de reconstruction des vaisseaux, notamment l'artère pulmonaire, afin, la plupart du temps, d'en augmenter le diamètre.
2. Boucher les orifices pathologiques du muscle cardiaque : orifice du septum inter-ventriculaire dans la maladie du sang bleu.
3. Effectuer des reconstitutions valvulaires, en cas d'insuffisance valvulaire.

Ce traitement des greffons permet d'éviter la formation d'anévrismes susceptibles de se rompre à plus ou moins long terme, au niveau du greffon. Il offre de plus la possibilité de conserver la capacité du greffon à croître au fur et à mesure de la croissance de l'enfant.

OBJECTIFS DU TRAVAIL :

La mucoviscidose est une maladie grave, dont le diagnostic des formes frustres est difficile.
La mesure de la ddp trans- épithéliale permet de diagnostiquer ces formes limites.
La solution à base de glutaraldéhyde est déjà fabriquée par la pharmacie de l'hôpital Necker-Enfants malades, selon la formule fournie par le service de chirurgie cardiaque, ceci afin de garantir l'approvisionnement en glutaraldéhyde 0,62% indispensable pour la réalisation de certaines interventions, aucune autre méthode de traitement des greffons n'étant disponible.
La réalisation des solutions de Kreb's et des solutions à base de glutaraldéhyde est nécessaire.
Néanmoins, la fabrication de ces préparations ne peut être envisager sans avoir cherché une alternative à l'utilisation d'une substance ayant le statut de réactif.
L'objectif du travail est de palier à l'absence de statut pharmaceutique des matières premières à base d'HEPES, rendant leur utilisation en l'état impossible dans les préparations pour usage chez l'homme. Le but est d'essayer de rendre ces matières premières pharmaceutiques par la réalisation des contrôles adéquates (identification, recherche des impuretés, dosage), ou en trouvant une substance susceptible de se substituer à l'HEPES dans les solutions de Kreb's et les solutions à base de glutaraldéhyde.

METHODOLOGIE :

Le travail se subdivise en deux grandes étapes :

- Réalisation d'une étude de pré-formulation de l'HEPES destinée à mettre en évidence les caractéristiques chimiques, physiques, physiologiques, pharmacologiques et toxicologiques de l'HEPES. Le but de cette étude est double : rédaction d'une fiche de contrôle (identification, impuretés, dosage) pour le contrôle de la matière première et mise en évidence des caractéristiques chimiques et biologiques de l'HEPES qui motive son choix pour l'usage que l'on en fait. Cette étude de pré-formulation sera avant tout bibliographique.
- Recherche d'une substance de substitution de l'HEPES. Cette substance devra être pharmaceutique (fabriquée par un laboratoire pharmaceutique) ou susceptible de le devenir (contrôle d'identification et de pureté, recherche des impuretés) et d'approvisionnement facile. Dans un deuxième temps, cette substance devra permettre de réaliser les préparations avec une durée limite de conservation compatible avec l'activité de routine des services cliniques et de la pharmacie. La recherche de cette substance se fera en tenant compte des caractéristiques de l'HEPES, trouvées lors de l'étude de pré- formulation et motivant son utilisation dans les solutions de Kreb's et de glutaraldéhyde.

RESULTATS :

1)-Etude de pré-formulation de l'HEPES :

Etude chimique : [7]

Dénomination : Acide 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl] éthanesulfonique

Formule brut : $C_8H_{18}N_2O_4S$., MM= 238,3.

Formule développée :

PKa (22°C)= 7,41.

Point de fusion : 206- 240°C.

Spectre Infrarouge :

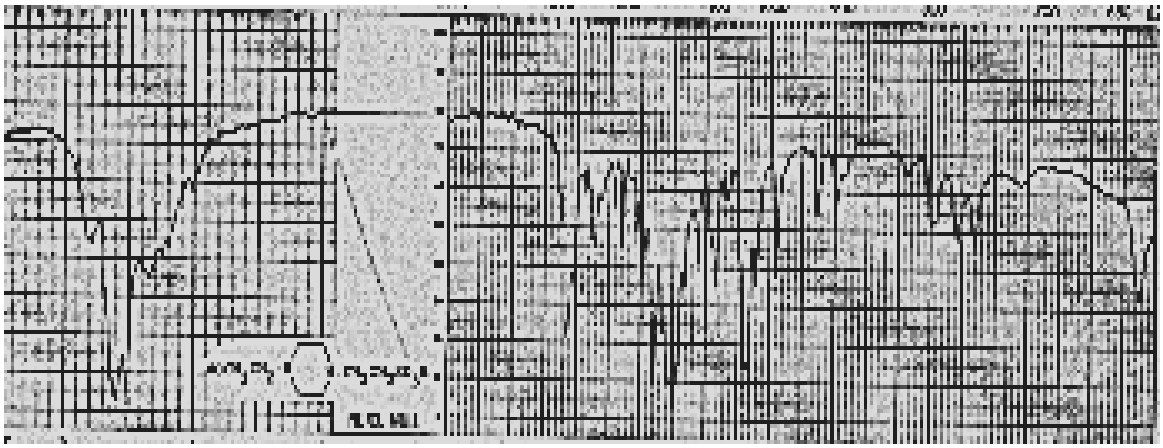

Figure 1 : Spectre IR de l'HEPES [8].

Spectre RMN :

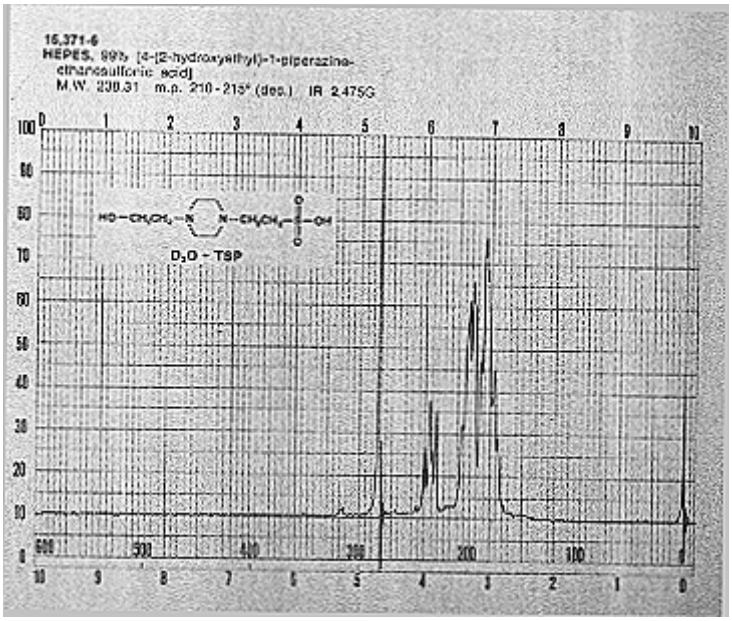

Figure 2 : Spectre RMN de la forme acide de l'HEPES [9].

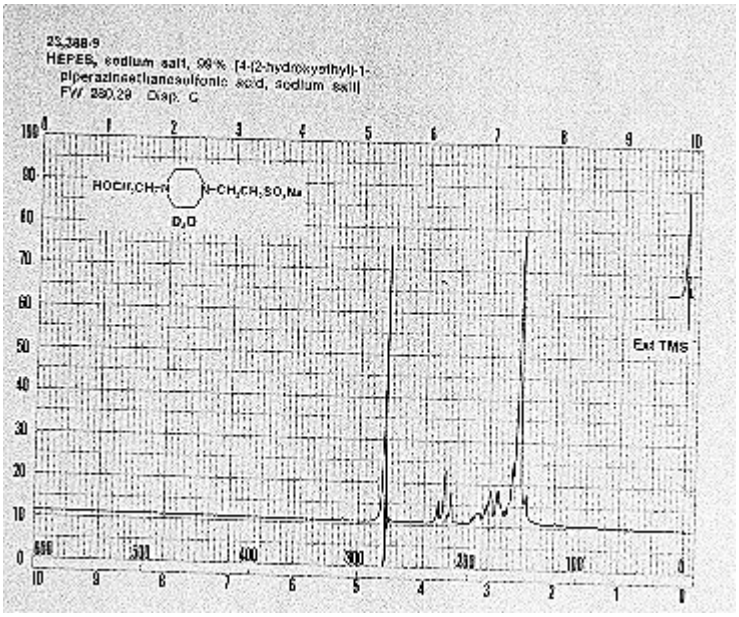

Figure 3 : Spectre RMN de la forme salifiée de l'HEPES [9].

Spectre UV :

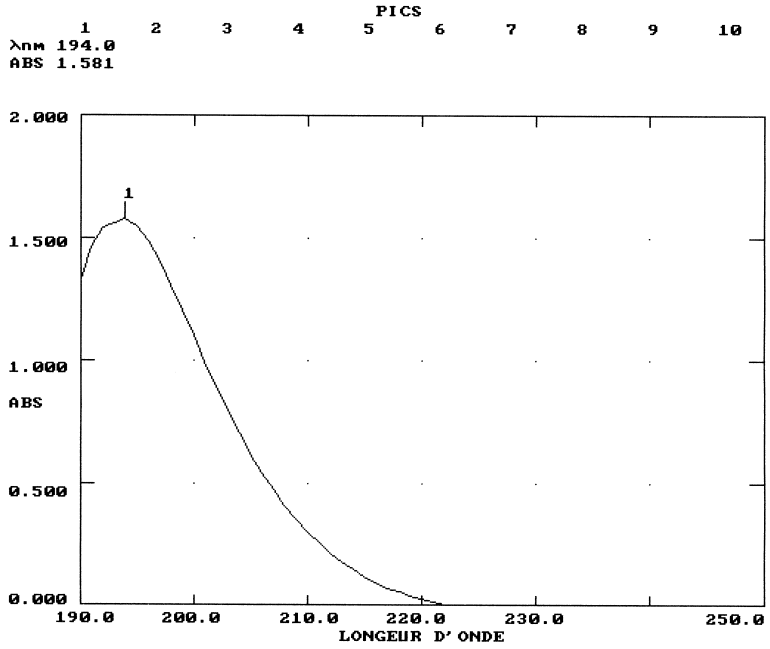

Figure 4 : Spectre UV de l'HEPES enregistré entre 190 et 250nm.

$E^{1cm}_{1\%}$ (194)= 66,35.

Spectre obtenu à partir d'une solution d'HEPES 0,001 M avec un spectrophotomètre à double faisceau UNICAM UV2 en utilisant des cuves en quartz.

Solubilité : soluble dans l'eau.

Incompatibilité physico- chimique : agents oxydants forts, acides forts.

Produits de dégradation : émission de vapeur de monoxyde de carbone, de dioxyde de carbone, oxyde d'azote et d'oxydes de soufre.

Modalités d'obtention : l'HEPES est un produit chimique courant, fourni par de nombreux laboratoires (SIGMA, MERCK) avec une pureté, annoncée sur les bulletins d'analyse fournis par les laboratoires, de plus de 99 %. Mais aucun fournisseur n'accepte de communiquer les modalités de synthèse et les produits apparentés. On peut juste dire que la séquence de synthèse fait intervenir et/ou produit [3, 10] : acide acétique sous forme d'acide acétique glaciale, N-(2-hydroxyethyl)piperazine et chloroethanesulfonate de sodium. Le N- (2-hydroxyéthyl)pipérazine est un produit irritant ayant néanmoins une faible toxicité (DL_{50}= 4920mg/ kg chez le rat), utilisé uniquement en synthèse organique [11]. Le chloroéthanesulfonate de sodium est un produit utilisé en synthèse organique, capable d'irriter

la peau et les muqueuses. L'acide acétique est produit caustique pouvant occasionner en cas d'ingestion : vomissements, hématémèse, diarrhées, collapsus circulatoire, urémie et décès. En cas d'exposition chronique à l'acide acétique, on peut avoir une érosion dentaire, une irritation des yeux et des bronches.

Propriétés physiologiques :

Pharmacologie : L'HEPES étant un composé chimique de laboratoire, il existe peu de données sur ses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Néanmoins des études récentes ont montré que l'HEPES possède des propriétés anti-inflammatoires. De plus on recense un essai clinique d'administration par voie parentérale à des patients atteints d'un cancer [12]. Cet essai limité (seulement 3 patients) a montré une amélioration de l'état de ces patients avec une diminution de la douleur, objectivées par la diminution des doses d'analgésiques et par une diminution des marqueurs tumoraux. Enfin, un brevet a été déposé concernant l'utilisation d'HEPES et de ses dérivés comme agents anti-inflammatoires [13]. Cette action anti-inflammatoire et antitumorale proviendrait d'une stimulation du système immunitaire. L'HEPES aurait également des propriétés vasodilatatrices selon des études *in-vitro* réalisées sur des artères de chiens [14] et inotropes négatives [15] quand la concentration en sodium et/ ou calcium diminue. Les propriétés vasodilatatrices seraient dues à la génération de peroxyde d'hydrogène et d'autres radicaux libres. Enfin l'HEPES est susceptible de bloquer les canaux ioniques aux ions chlorures, quand il est sur la face intra-cytoplasmique de ces canaux [16, 17] ce qui arrive rarement étant donné que l'HEPES pénètre peu voir pas du tout dans les cellules [17].

Toxicologie : Comme pour la pharmacologie, on dispose de peu de données concernant la toxicité de l'HEPES. On peut juste citer une expérience d'administration par voie parentérale, chez des chiens de race beagle [18]. Cette expérience n'a pas montré de toxicité immédiate, mais a permis de mettre en évidence une modification du myélogramme dans le sens de l'hyper- cellularité et l'apparition d'un phénomène d'hématopoïèse au niveau du foie à partir d'une dose de 400 mg/kg. Cette dose correspond au bras des hautes doses de l'étude, ce qui fait conclure par les auteurs à la grande marge thérapeutique du produit. Cette expérience n'a cependant pas étudié les propriétés cancérigènes, mutagènes et les effets sur la fertilité et la descendance.

Utilisation :

L'HEPES est une molécule ayant des propriétés de zwitterion (molécule neutre aussi bien à l'état protonné que déprotonné). Son pKa est proche du pH physiologique. On l'utilise donc comme tampon dans des expériences de biologie cellulaire [7].

Elle est produite par différents laboratoires. Si tous les laboratoires fournissent un produit d'une pureté supérieure ou égale à 99%, les contrôles effectués sur le produit fini sont différents d'un laboratoire à un autre et en fonction de la forme de commercialisation (Tableau 1,2,3 et 4).

Tableau 1 : HEPES fourni par le laboratoire DOJINDO [18].

Nom	HEPES
Présentation	Poudre cristalline blanche
Pureté	> 99 %
Contaminants	Sulfates < 0,1 % Métaux lourds < 0,0005 % Fer < 0,0005 %

Le laboratoire japonais DOJINDO ne fabrique l'HEPES que sous forme de poudre dont la qualité est très peu renseignée [19].

Tableau 2 : HEPES par le laboratoire MERCK [20]

Nom	HEPES acide libre qualité pour biologie moléculaire	HEPES acide libre solution à 1M qualité ULTROL	HEPES acide libre qualité ULTROL
Présentation	Poudre blanche	Solution	Poudre cristalline blanche
Pureté	≥ 99 %	≥ 99 %	≥ 99 %
Contaminants	Dnase : Non détectées Rnase : Non détectées Protéases : Non détectées	Chlorures < 0,01 % Sodium < 0,1 % Sulfates < 0,05 % Métaux lourds < 1 ppm Solutions stériles	Chlorures ≤ 0,01 % Sodium ≤ 0,1 % Sulfates ≤ 0,05 % Métaux lourds ≤ 1 ppm
Autres	Stabilité de 3 ans.	Stabilité de 3 ans	Stabilité de 5 ans

Le laboratoire MERCK commercialise 3 formes d'HEPES, dont une solution stérile dont la concentration en métaux lourds est inférieure à la limite fixée par la pharmacopée (1- 2 ppm), mais dont la concentration en sulfates est supérieure à la teneur limite fixée par cette même pharmacopée (10 ppm = 0,001%).

Le groupe SIGMA-ALDRICH fournit de nombreuses présentations d'HEPES, par l'intermédiaire de ses différentes filiales. Schématiquement, on peut distinguer 4 présentations : HEPES acide libre, HEPES sous forme de sel de sodium, HEPES sous forme de sel de potassium, HEPES sous forme d'hémi-sel de sodium, HEPES en solution. Seules l'HEPES sous forme d'acide libre (Tableau 3) ou en solution (Tableau 4) nous intéressent. En effets, les formes salifiées de l'HEPES sont susceptibles d'apporter du sodium ou du potassium, modifiant les caractéristiques des solutions préparées.

Tableau 2 : HEPES sous forme de poudre produit par le groupe SIGMA- ALDRICH [21]

Fournisseur	SIGMA	SIGMA	SIGMA	SIGMA
Code	H7523	H6147	H4034	H3375
Pureté	> 99,5%	> 99,5%	> 99,5%	> 99,5%
Contaminants	Cl< 0,005% K< 0,005% Ca< 0,001% Al< 0,0005% As< 0,0001% Ba< 0,0005% Bi< 0,0005% Cd< 0,0005% Co< 0,0005% Cr< 0,0005% Cu< 0,0005% Fe< 0,0005% Li< 0,0005% Mg< 0,0005% Mn< 0,0005% Na< 0,0005% Ni< 0,0005% Pb< 0,0005% Sr< 0,0005% Zn< 0,0005%	Métaux lourds < 5 ppm.	Métaux lourds < 5 ppm. Fer < 5 ppm Dnase, Rnase et protéases non détectées. Endotoxines testées.	
Autres	Perte à la dessication (110°C)< 1% Cendres sulfuriques < 0,1%	Embryo testé		

Tableau 2 (suite): HEPES sous forme de poudre produit par le groupe SIGMA- ALDRICH [21]

Fournisseur	FLUKA	FLUKA	FLUKA	FLUKA
Code	54461	54459	54457	54455
Pureté	≥ 99,5%	≥ 99,5%	≥ 99,5%	≥ 99,5%
Contaminants	Cl< 0,005% K≤ 0,005% SO4≤ 0,005% Ca≤ 0,005% Cd≤ 0,0005% Co≤ 0,0005% Cr≤ 0,0005% Cu≤ 0,0005% Fe≤ 0,0005% Mg≤ 0,01% Mn≤ 0,0005% Na≤ 0,005% Ni≤ 0,0005% Pb≤ 0,0005% Zn≤ 0,0005%	Cl< 0,005% K≤ 0,005% SO4≤ 0,005% Ca≤ 0,001% Al≤ 0,0005% As≤ 0,00001% Ba≤ 0,0005% Bi≤ 0,0005% Cd≤ 0,0005% Co≤ 0,0005% Cr≤ 0,0005% Cu≤ 0,0005% Fe≤ 0,0005% Li≤ 0,0005% Mg≤ 0,0005% Mn≤ 0,0005% Mo≤ 0,0005% Na≤ 0,005% Ni≤ 0,0005% Pb≤ 0,0005% Sr≤ 0,0005% Zn≤ 0,0005%	Cl≤ 0,005% K≤ 0,005% SO4≤ 0,005% Ca≤0,001% Al≤ 0,0005% As≤ 0,00001% Ba≤ 0,0005% Bi≤ 0,0005% Cd≤ 0,0005% Co≤ 0,0005% Cr≤ 0,0005% Cu≤ 0,0005% Fe≤ 0,0005% Li≤ 0,0005% Mg≤ 0,0005% Mn≤ 0,0005% Mo≤ 0,0005% Na≤ 0,005% Ni≤0,0005% Pb≤ 0,0005% Sr≤ 0,0005% Zn≤ 0,0005%	Cl≤ 0,005% K≤ 0,005% SO4≤ 0,005% Ca≤0,001% Al≤ 0,0005% As≤ 0,00001% Ba≤ 0,0005% Bi≤ 0,0005% Cd≤ 0,0005% Co≤ 0,0005% Cr≤ 0,0005% Cu≤ 0,0005% Fe≤ 0,0005% Li≤ 0,0005% Mg≤ 0,0005% Mn≤ 0,0005% Mo≤ 0,0005% Na≤ 0,005% Ni≤0,0005% Pb≤ 0,0005% Sr≤ 0,0005% Zn≤ 0,0005%
	Pàd ≤ 0,5% Cs ≤ 0,1%	Pàd≤ 0,5% Cs≤ 0,1%. Matières insolubles : -.	Pàd≤ 0,5% Cs≤ 0,1%. Matières insolubles : - Dnase, Rnase, Protéases, phosphatases : -	Pàd≤ 0,5% Cs ≤ 0,1%. Matières insolubles : -. Test de luminescence : -

Pàd : Perte à la dessication ; Cs : Cendres sulfuriques

Tableau 4 : Solution d'HEPES fabriquées par le groupe SIGMA- ALDRICH [21].

* : HEPES sous forme de sel de sodium (H3784) : pureté> 99,5%, [métaux lourds]< 5 ppm, fer< 5ppm, Dnase et Rnase : -, Protéases : -, apyrogène.

Fournisseur	FLUKA	SIGMA
Code	51558	H0887
Formule	HEPES : 10 g/l NaCl : 16 g/l KCl : 0,74 g/l Na_2HPO_4, $2H_2O$: 0,27 g/l Dextrose : 2 g/l	HEPES : 1M Correspondant à un mélange d'HEPES acide libre (H4034) et HEPES sous forme de sel de sodium (H3784)*.
Contaminants	Al ≤ 0,0001% Ba ≤ 0,0001% Bi ≤ 0,0001% Ca ≤ 0,0005% Cd ≤ 0,0001% Co ≤ 0,0001% Cr ≤ 0,0001% Cu ≤ 0,0001% Fe ≤ 0,0001% Li ≤ 0,0001% Mg ≤ 0,0001% Mn ≤ 0,0001% Mo ≤ 0,0001% Ni ≤ 0,0001% Pb ≤ 0,0001% Sr ≤ 0,0001% Zn ≤ 0,0001%	
Autres	Matières insolubles : - Dnase, Rnase : - Protéases, phosphatases : -	Solution stérile et apyrogène.

L'ensemble de forme d'HEPES produite par le groupe SIGMA- ALDRICH a une teneur théorique en métaux lourd supérieure à la teneur prévue par la pharmacopée européenne sous la rubrique "essai limite des métaux lourds".
Il faut noter que ce groupe fourni deux solutions d'HEPES dont la teneur en HEPES est supérieure ou égale à 99,5%. Cependant la solution produite par le laboratoire FLUKA ne semble pas pouvoir être utilisée, celle ci contenant un tampon phosphate et du dextrose dont l'effet dans les solutions de Kreb's et les solutions de glutaraldéhyde n'est pas documenté.

2)-Recherche d'un tampon pour le test diagnostic :

Description du test :

Principes :

Les canaux ioniques sont impliqués dans le maintien des caractéristiques physico-chimiques du milieu intracellulaire. Leur fonctionnement induit pour chaque ion (sodium, potassium, calcium, magnésium, etc.) une dissymétrie de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique. Pour les ions sodium, potassium et chlorure, cette dissymétrie induit une différence de potentiel entre les deux faces de la membrane plasmatique. La technique de mesure de cette différence de potentiel (ddp) est connue depuis le début des années 1980 [22]. La mucoviscidose touchant les canaux chlore par modification de leur fonctionnement, elle induit une modification de la répartition des ions chlorures de part et d'autre de la membrane plasmique, d'où une modification de la différence de potentiel, ce qui permet d'utiliser cette mesure de la ddp comme un test diagnostic de la mucoviscidose. Cette technique est utilisée pour les patients présentant les signes cliniques de la mucoviscidose avec un test à la sueur limite, un dépistage et une recherche par biologie moléculaire négative. L'importance de la variation de la ddp est corrélée avec la gravité de la maladie [4]. Chez les sujets atteints de mucoviscidose, la ddp est inférieure (-41mV) à celle des sujets sains (-19mV). Cependant la répartition est large pour les deux populations [2]. Aussi pour améliorer le test, la technique initiale a été modifiée, pour rendre le test plus sensible.

Technique [2] :

La réalisation du test nécessite l'utilisation de 3 types de solution pour l'irrigation de l'électrode de mesure :

- Une solution de Ringer lactate permettant de faire le blanc de l'appareillage de mesure.
- Une solution de Kreb's HEPES A permettant de faire la ligne de base de l'appareil.

- Une solution de Kreb's HEPES B dite pauvre en ions chlorures.

Les solutions de Kreb's utilisées sont inspirées de la solution de Kreb's Henseleit (Annexe 2), milieu fréquemment utilisé pour la biologie cellulaire, et dont on a remplacé le tampon Phosphates/ Bicarbonates par de l'HEPES, substance ne pénétrant pas dans les cellules.

Le test se déroule en plusieurs étapes :

1. Introduction au niveau nasal (Figure 5) d'une sonde de Foley contenant du gel pour ECG. Une sonde de Foley est un type de sonde urinaire, ayant deux branches (Photographie 1). Dans cette sonde, est introduite une électrode de mesure. Cette électrode est l'électrode du pôle apical de la cellule.

Photographie 1 : Sonde de Foley

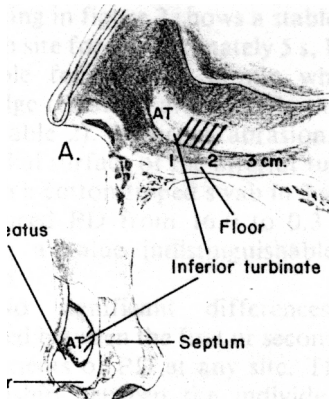

Figure 5 : Anatomie des fosses nasales

2. Pose d'une électrode, dite électrode de référence, au niveau de l'avant bras après avoir réalisé une abrasion de la peau. Cette électrode est considérée comme l'électrode se situant sur le pôle basal des cellules.

3. Déplacement de l’électrode nasale, à l’intérieur de la cavité nasale jusqu'à trouver le site présentant la ddp la plus grande. Durant toutes ces manipulations, l’intérieur de la sonde de Foley est perfusé à l’aide d’une solution de Ringer lactate.
4. Perfusion dans la sonde de Foley, de la solution de Kreb’s, permettant de faire la ligne de base. On peut voir à ce stade, une différence entre les sujets malades et les sujets sains. En effet, la ddp chez le sujet sain est proche de –20mV, contre –40mV chez le sujet atteint de mucoviscidose.
5. Perfusion d’un mélange solution de Krebs- amiloride. L’amiloride est une molécule bloquant l’absorption du sodium, provoquant une augmentation de la ddp. Chez le sujet malade, la capacité d’absorption est réduite, de sorte que l’ajout d’amiloride dans le milieu bloque la capacité résiduelle de sécrétion provoquant une brutale augmentation de la ddp, comparativement au sujet sain.
6. Perfusion d’amiloride dans une solution de Krebs pauvre en ions chlorures. La teneur faible en ions chlorures est destinée à stimuler la sécrétion des ions chlorures par les cellules, ce qui se traduit par une diminution de la ddp. En cas de mucoviscidose, la capacité de sécrétion des ions chlorures est diminuée.
7. Perfusion d’un mélange amiloride- isoprénaline dans une solution de Krebs pauvre en ions chlorures. L’isoprénaline est agoniste β, provoquant une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire activant les fonctions du canal chlore, d’où une augmentation de la sécrétion des ions chlorures avec pour conséquence une diminution de la ddp.

La ddp est enregistrée en permanence pour obtenir un graphique en fonction des temps où sont notés les changements du soluté de perfusion. Chaque modification de la nature du soluté perfusé induit chez le sujet sain, une variation brusque de la ddp, visible sous la forme d’une cloche sur le graphique, alors que chez le sujet atteint de mucoviscidose, ces variations sont inapparentes ou peu marquées. Ces variations sont observées à chaque modification des conditions du milieu (changement de la solution perfusée dans la sonde de Foley), sauf pour le passage de la solution de Kreb’s A à la solution de Kreb’s A supplémentée en amiloride.

Tableau 5 : Variation de la d.d.p en fonction des conditions opératoires

	Mucoviscidose	Sujet sain
Solution de Kreb's	d.d.p= - 40mV	d.d.p= - 20 mV
Solution de Kreb's + amiloride	↑↑ d.d.p	↑ d.d.p
Solution de Kreb's pauvre en chlorure + amiloride	Pas de variation de la d.d.p	↓ d.d.p
Solution de Kreb's pauvre en chlorure + amiloride + Isuprel	Pas de variation de la d.d.p	↓ d.d.p

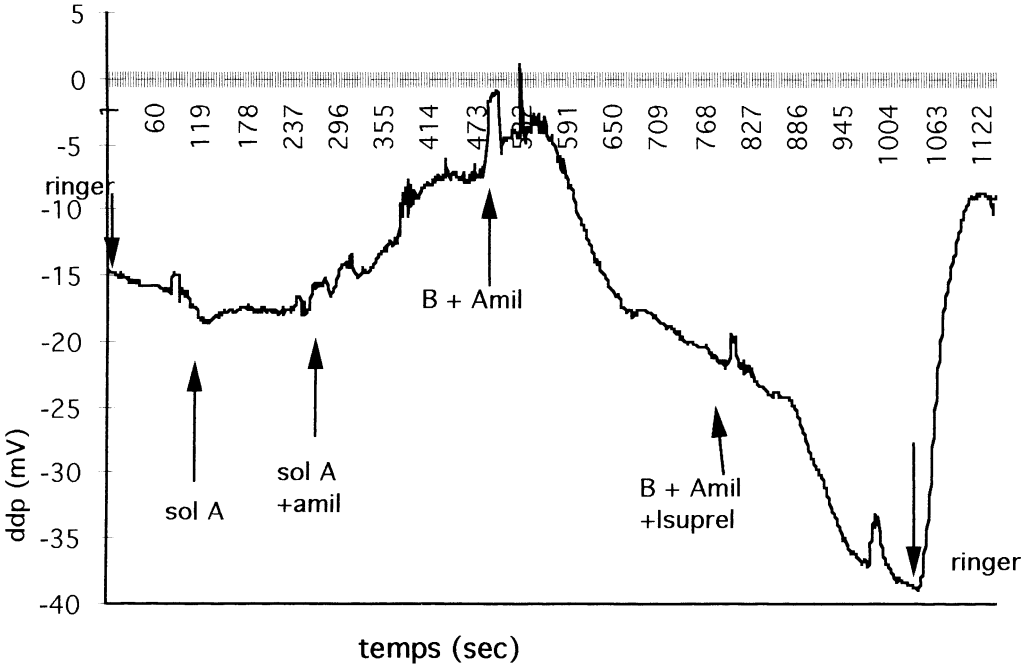

Figure 6 : Graphique obtenu chez un sujet sain.

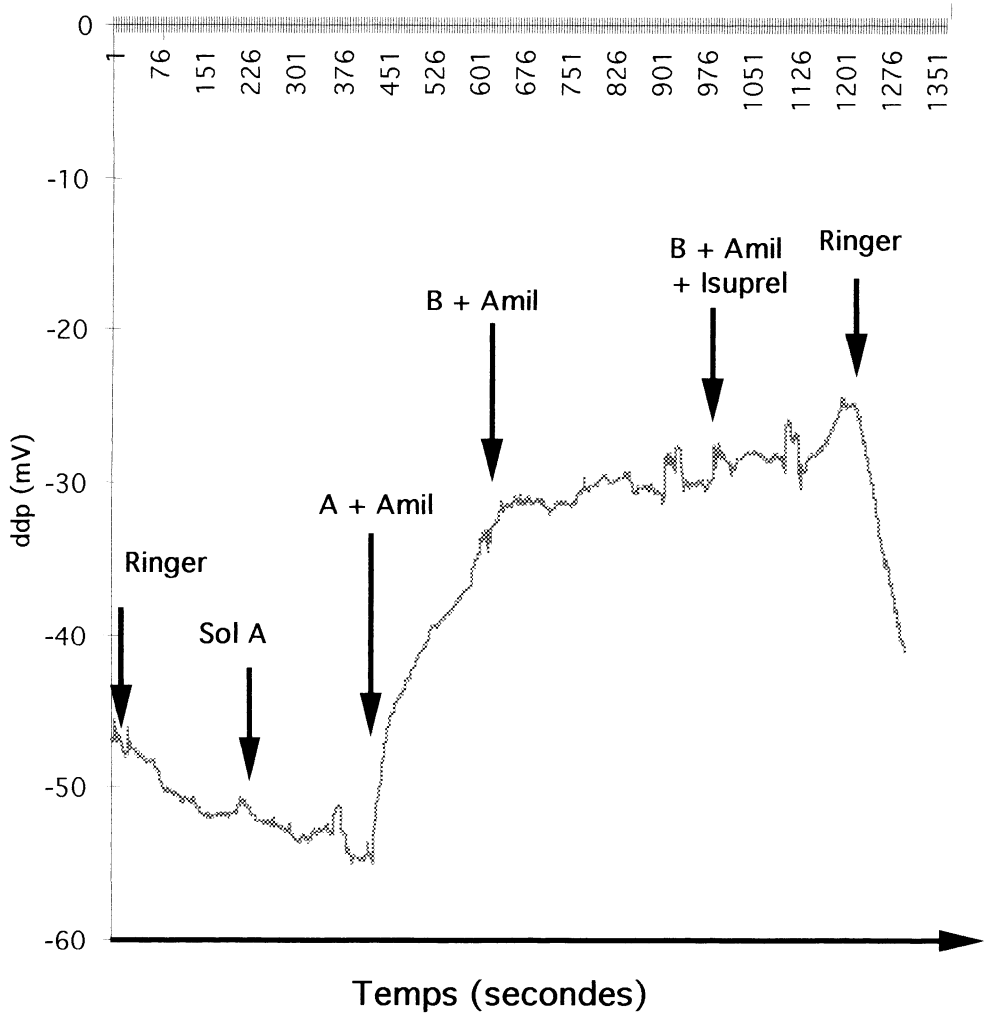

Figure 7 : Graphique obtenu chez un sujet atteint de mucoviscidose.

Propriétés nécessaires à un tampon pour être utilisable dans ce test :

Pour être utilisable dans ce test diagnostic, la substance tampon doit :

- Ne pas perturber l'activité des canaux ioniques par une action pharmacologique ou par modification des conditions physico-chimiques du milieu.
- Avoir un pKa proche du pH physiologique, ceci afin de fabriquer une solution dont le pH est proche du pH physiologique. En effet, le fonctionnement des canaux ioniques est dépendant des conditions du milieu, et notamment du pH.
- Ne pas pénétrer dans les cellules pour ne pas perturber les propriétés physico- chimiques du cytoplasme, l'activité des canaux ioniques étant influencée par le milieu intra-cellulaire (concentration des différents ions, pH). Dans le cas de la CFTR, une modification du pH entraîne une modification de la conductance des ions chlorures, mais également une modification de l'activation de cette protéine par la proteine kinase A impliquée dans l'activation de la CFTR par phospharylation [23, 24].

Etudes de substances tampons :

Il existe de nombreuses substances tampons utilisées en biologie. Ces substances se subdivisent en deux grands groupes : les substances pénétrant dans les cellules (Tableau 4), et les substances ne pénétrant pas dans les cellules (Tableau 5). Au sein de chaque groupe, les substances sont ensuite classées en fonction de leur pKa.

Tableau 6 : Tampons usuels en biologie [25]. * Tampon dont les composants sont inscrits à la pharmacopée. ** Tampon pharmacopée.

Nom	**Utilisation (pH)**
KCl/ HCl **	1,0- 2,2
Glycocolle/ HCl	1,2- 3,4
Citrate de sodium/ HCl*	1,2- 5
Biphtalate de potassium/ HCl	2,4- 4,0
Biphtalate de potassium/ NaOH	4,2- 6,2
Citrate de sodium/ NaOH *	5,2- 6,6
Phosphates **	5,0- 8,0
Barbital de sodium/ HCl **	7,0- 9,0
Borate de sodium/ HCl**	7,8- 9,2

Glycocolle/ NaOH	8,6- 12,8
Borate de sodium/ NaOH **	9,4- 10,6
Acide citrique/ Phosphates *	2,2- 7,8
Citrate- Phosphates- Borates/ HCl*	2,0- 12,0
Acétates **	3,8- 5,6
Acide diéthylglutarique/ NaOH	3,2- 7,6
Pipérazine/ HCl *	4,6- 6,4 8,8- 10,6
Tétraéthyléthylènediamine	5,0- 6,8 8,2- 10,4
Tris- Maléate **	5,2- 8,6
Diéthyléthylènediamine	5,6- 7,4 8,6- 10,4
Imidazole/HCl **	6,2- 7,8
Triéthanolamine/ HCl	7,0- 8,8
N- diméthylaminaminoleucylglycocolle/ NaOH	7,0- 8,8
Tris/ HCl **	7,2- 9,0
2- amino-2- méthylpropane-1,3-diol/ HCl	7,8- 10,0
Carbonates *	9,2- 10,8

De nombreux tampons de ce groupe ont leurs composants inscrits à la pharmacopée européenne, et certains mélanges sont même classés sous la rubrique tampons de cette même pharmacopée.

Tableau 7 : Substances tampons ne pénétrant pas dans les cellules [17].

Tampon	**Pka**
Acide 2-(N- morpholino)- éthane sulfonique (MES)	6,15
Acide N-2- Acétamido- diacétique (ADA)	6,60
Acide pipérazine- N,N' bis(2- éthane- sulfonique) (PIPES)	6,80
Acide N- 2- acétamido 2- aminoéthane sulfonique (ACES)	6,90
Acide 3-(N- morpholino)- propane sulfonique (MOPS)	7,20
Acide N- tris(hydroxymethyl)- méthyl 2-aminoéthanesulfonique (TES)	7,50
Acide N- 2 hydroxyethyl pipérazine- N'- 2 éthane sulfonique (HEPES)	7,41
Acide N- 2- hydroxyéthyl pipérazine- N'- 3 propane sulfonique (HEPPS)	8,00
N- tris (hydroxyméthyl) méthylglycine (Tricine)	8,15
N,N'- bis(2- hydroxyéthyl) glycine (Bicine)	8,35
Glycylglycine	8,40
Acide N- tris (hydroxyméthyl) méthyl 3- amino- propane sulfonique (TAPS)	8,55
Acide cyclohéxyl amino éthane sulfonique (CHES)	9,50
Acide 3- (cyclohexylamino)- propane sulfonique (CAPS)	10,40

Aucune de ces substances n'est inscrite à la pharmacopée européenne.

On constate que si certaines substances du Tableau 5 (MOPS, TES) sont susceptibles de se substituer à l'HEPES : pas de pénétration dans les cellules, pK proche du pH physiologique. Aucune de ces substances ne remplit la condition nécessaire à une utilisation en médecine humaine : l'inscription à la pharmacopée.

Conclusion :

Les substances susceptibles d'être utilisée comme tampon dans les solutions de Kreb's utilisées pour le diagnostic de la mucoviscidose, doivent : Ne pas perturber l'activité des canaux ioniques, avoir un pKa proche du pH physiologique et ne pas pénétrer dans les cellules. S'il existe des substances inscrites à la pharmacopée remplissant les deux premières conditions, aucune ne remplit la troisième condition, car toutes peuvent pénétrer dans les cellules. De ce fait on doit utiliser une substance non inscrite à la pharmacopée remplissant les trois conditions comme le TES ou le MOP ou l'HEPES. On peut donc dire que l'HEPES ne peut pas être remplacé par une substance inscrite à la pharmacopée.

3)- Recherche d'un tampon pour la solution de glutaraldéhyde :

Utilisation de la solution de glutaraldéhyde :

Mode d'emploi : [26]

- Prélèvement d'un fragment de péricarde chez le patient.
- Immersion du fragment dans la solution de glutaraldéhyde durant 10 minutes.
- Rinçage du greffon avec du NaCl 0,9%.

Intérêts :

La solution de glutaraldéhyde a été mise au point par l'équipe du Professeur A. Carpentier, lors des essais d'hétérogreffes à partir de greffons porcins. Lors de ces recherches, cette équipe a pu constater 3 catégories de phénomènes de dégradation du greffon après la greffe nécessitant à terme une ré-intervention [6] :

- Réactions immunologiques de rejet du greffon.
- Réactions inflammatoires.
- Dénaturation des fibres de collagène aboutissant à la formation d'anévrismes au niveau du greffon.

Pour éviter ces phénomènes, les greffons doivent subir une étape de conditionnement pour les préserver. Ce traitement doit préserver les qualités mécaniques du greffon, tout en prévenant les réactions immunologiques et la dégradation du collagène. Le traitement par la glutaraldéhyde présente toutes ces propriétés : désinfection, dénaturation des molécules de HLA médiateur de la réaction immune, formation de liaison intra-chaînes entre les 3 chaînes peptidiques du collagène et inter-chaînes renforçant sa stabilité [6]. Ce traitement ne préserve cependant pas le greffon du phénomène de calcification à long terme, car la glutaraldéhyde ne dégrade pas l'intégralité des molécules de phosphatases alcalines impliquées dans le phénomène [27]. Ce traitement vise aussi bien à tanner le tissu (utilisation de concentration de l'ordre de 0,62%), qu'à conserver le tissu sur un longue durée (utilisation de concentration de l'ordre de 0,2%). Il permet également d'assurer la « stérilité » [6] des greffons, la solution étant utilisée à ce moment à la concentration de 0,2%. Dans l'utilisation faite à Necker-Enfants malades, c'est l'effet tannant de la glutaraldéhyde qui est essentiellement recherché.

Fabrication des solutions de glutaraldéhyde :

Choix d'un tampon :

La formule qui est demandée par le service prescripteur contient de l'HEPES (Annexe 2). Or d'après la littérature, la solution utilisée initialement par l'équipe du Professeur A. Carpentier contenait un tampon à base de phosphates.

Après entretien avec Madame Carpentier, il s'avère que l'HEPES n'est pas indispensable pour la fabrication des solutions de glutaraldéhyde, de sorte que l'équipe de chirurgie cardiaque de l'hôpital Broussais est revenue à la formule initiale mise au point en 1969. La formule contenant de l'HEPES a été mise au point au cours des années 1970 dans le but d'être utilisée sur des cultures cellulaires pour étudier le mécanisme d'action de la glutaraldehyde sur le tissu péricardique.

La formule demandée par le service de chirurgie cardiaque de l'hôpital pourra donc être remplacée par la formule publiée par l'équipe du Professeur A. Carpentier [6].

Glutaraldéhyde 0,62% pH 7,4

Eau ppi : 800ml.

KH_2PO_4 anhydre : 0,416 g

Na_2HPO_4 anhydre : 2,404 g

NaCl : 5,3 g

Glutaraldéhyde 25% : 25 ml

Ajuster le pH à 7,4 avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique.

Compléter à 1000ml avec de l'eau ppi

Problème de la glutaraldéhyde :

La solution de glutaraldéhyde servant de matière première est titrée à 25%. La glutaraldéhyde est inscrite à la pharmacopée britannique et à la pharmacopée nord américaine sous forme d'une solution concentrée à 50%. Son contrôle est donc possible en suivant l'une ou l'autre des deux monographies.

Tableau 8 : Comparaison des monographies de la glutaraldéhyde [28, 29].

	Britannique	**Nord américaine**
Identification	- Réaction avec du chlorhydrate d'hydroxylamine et de l'acétate de sodium. – Réaction avec du nitrate d'argent ammoniacal → Précipité d'argent.	Réaction à la 2,4-Dinitrophénylhydrazine → 2,4 dinitrophénylhydrazone
Essai		- Métaux lourd < 0,001% - pH : 3,7- 4,5
Dosage	Dosage par retour utilisant du chlorhydrate d'hydroxylamine et de la soude.	Dosage par retour utilisant une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine, une solution de triethanolamine et de l'acide sulfurique.

La glutaraldéhyde peut être obtenue auprès de Coopérative pharmaceutique (Cooper), qui la commercialise sous la forme d'une solution à 25%. Cette solution est proposée comme désinfectant et comme agent de stérilisation pour les instruments non autoclavables. Elle peut

également être utilisée en médecine humaine pour le traitement des verrues, pure ou après dilution à une concentration de 10%, ainsi que dans le traitement des hyperhydrose plantaire après avoir ramené la concentration à 10%.

La glutaraldéhyde pouvant être obtenu auprès d’un laboratoire pharmaceutique pour une utilisation en médecine humaine, il ne semble pas y avoir d’obstacle réglementaire à son utilisation pour traiter des fragments de péricarde, une simple réaction d’identification devant néanmoins être réalisée (Tableau 7).

CONCLUSIONS :

L'HEPES est une substance tampon très connue en biologie cellulaire et moléculaire. On recense des références bibliographiques contenant le mot « HEPES » depuis la fin des années 60. Cependant si dans le domaine des manipulations en biologie cellulaire, on dispose de nombreuses informations sur l'HEPES et sur ses avantages, les références sur ses propriétés physiologiques, pharmacologiques et toxicologiques sont peu nombreuses. Le faible nombre d'études disponibles à ce jour indique que l'HEPES ne semble pas avoir de toxicité aiguë particulière et aurait des propriétés anti- inflammatoires.

L'utilisation d'un tampon phosphate dans les solutions à base de glutaraldéhyde est possible de part la littérature, l'utilisation de l'HEPES pour ces solutions ne se justifie donc absolument plus. La formule fournie par le service de chirurgie cardiaque peut donc être substituée par une formule contenant un tampon phosphate. La pharmacie de l'hôpital Necker- Enfants malades fabriquera donc les solutions à base de glutaraldéhyde à l'aide d'un tampon phosphate dont les éléments sont disponibles auprès de laboratoires pharmaceutiques, le tampon phosphate étant inscrit à la pharmacopée européenne, et de glutaraldéhyde obtenue auprès de la coopérative pharmaceutique.

Le test diagnostic de la mucoviscidose par mesure de la ddp trans- épithéliale nécessite l'utilisation de solutions tamponnées dont le tampon ne doit pas altérer le fonctionnement des canaux ioniques que ce soit par ses propriétés pharmacologiques ou par ses propriétés physico- chimiques. Le tampon ne doit notamment pas pénétrer dans les cellules. L'analyse des monographies de la pharmacopée européenne indique qu'aucune des substances tampons qui y sont inscrites ne répond à ce dernier critère, de sorte que l'on est obligé d'envisager l'utilisation d'une substance non pharmaceutique ayant subie au préalable des contrôles aptes à garantir son identité, sa pureté et l'absence d'impuretés à effets notoires en quantités excessives. Ces éléments font que l'on doit s'orienter vers l'utilisation d'HEPES ayant subi au préalable des contrôles. Le choix de la matière première est arrêté sur la solution stérile d'HEPES fournie par le laboratoire SIGMA, le caractère stérile de cette solution étant un gage pour la bonne conservation des solutions préparées avec cette matière première. Cette solution devra subir pour chaque lot reçu :

- La réalisation d'un spectre UV devant mettre en évidence le pic d'absorption à 194 nm, concourant au faisceau de présomption sur l'identité de la matière première.

- Essai de recherche de métaux lourds selon la méthode de la pharmacopée avec du thioacétamide mettant en évidence le plomb, métaux lourds le plus abondant dans l'environnement. Les métaux lourds sont recherchés à cause de leur toxicité notoire sur l'organisme.
- Essai de recherche des sulfates selon la méthode de la pharmacopée au chlorure de baryum. En effet, l'HEPES est une molécule présentant une fonction acide sulfonique. Il est donc légitime de penser que sa synthèse inclut l'utilisation d'ion sulfates.
- Essai de recherche de l'arsenic. L'arsenic est recherché à cause de sa toxicité.

Les contaminants recherchés peuvent aussi être mis en évidence par des méthodes autres que celles décrites à la pharmacopée, à condition qu'elles aient été validées vis-à-vis de la méthode de la pharmacopée, celle- ci servant de référence

Le dosage n'est pas réalisé car la solution contient deux formes différentes de l'HEPES (acide libre et sel de sodium). De même, les impuretés ne peuvent être recherchées, leur identité étant inconnue.

ANNEXE 1 : Composition de la solution à base de Glutaraldéhyde.

Glutaraldéhyde 25% : 48 ml
NaCl 20% : 48 ml
$MgCl_2$, $6H_2O$ 10% : 80 ml
Tampon HEPES 1M stérile et apyrogène : 40 ml
Eau pour préparation injectable : 1770 ml

Cette solution de glutaraldéhyde doit être préparée de manière stérile, d'une part pour assurer une bonne conservation et d'autre part parce que cette solution est destinée à être mise en contact avec des fragments de péricarde devant rester stériles.

ANNEXE 2 : Composition des solutions de KREB'S

.

Solution de Kreb's HEPES A :

NaCl : 8,18 g/l
KCl : 0,44 g/l
$MgCl_2$, $6H_2O$: 0,20 g/l
$CaCl_2$, $2H_2O$: 0,30 g/l
Glucose : 1,80 g/l
HEPES : 2,38 g/l

$[Na^+]$= 140 mmol/l
$[K^+]$ = 6 mmol/l
$[Cl^-]$= 152 mmol/l
$[Ca^{2+}]$= 2 mmol/l
$[Mg^{2+}]$= 1 mmol/l

Solution de Kreb's HEPES B :

Gluconate de sodium : 30,54 g/l
Gluconate de potassium : 1,44 g/l
$MgCl_2$, $6H_2O$: 0,20 g/l
$CaCl_2$, $2H_2O$: 0,30 g/l
Glucose : 1,80 g/l
HEPES : 2,38 g/l

$[Na^+]$= 140 mmol/l
$[K^+]$= 6 mmol/l
$[Cl^-]$= 6 mmol/l
$[Ca^{2+}]$= 2 mmol/l
$[Mg^{2+}]$= 1 mmol/l

Solution de Kreb's Henseleit :

NaCl : 118 mmol/l
KCl : 4,7 mmol/l
$CaCl_2$: 2,5 mmol/l
$MgSO_4$: 1,2 mmol/l
KH_2PO_4 : 1,2 mmol/l
$NaHCO_3$: 25 mmol/l
Glucose : 10 mmol/l

$[Na^+]$= 143 mmol/l
$[K^+]$= 5,9 mmol/l
$[Cl^-]$= 127,7 mmol/l
$[Ca^{2+}]$= 2,5 mmol/l
$[Mg^{2+}]$= 1,2 mmol/l

Les solutions de Kreb's A et B sont préparées de manière stérile. En effet, la stérilité est un élément permettant d'assurer la conservation de ces solutions.

BIBLIOGRAPHIE :

1)- Code de la santé publique, Edition 1997

2)- P.G Middleton, D.M Geddes, E.W.F.W Alton ; Protocols for in vivo measurement of ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium ; European respiratory journal ; 1994, 7 : 2050- 2056.

3)- J Zhao, B Zerhusen, J Xie, M.L Drumm, P.B Davis, J Ma ; Rectification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel mediated by extracellular divalent cations ; Biophysical Journal ; 1996, 71: 2458- 2466.

4)- L.P Ho, J.M Samways, D.J Porteous, J.R Dorin, A Carothers, A.P Greening, J.A Innes ; Correlation between nasal potential difference measurements, genotype and clinical condition in patients with cystic fibrosis ; European respiratory journal ; 1997, 10 : 2018- 2022.

5)- E.W.F.W Alton, D Currie, R Logan- Sinclair, J.O Warner, M.E Hodson, D.M Geddes ; Nasal potential difference : a clinical diagnostic test for cystic fibrosis ; European respiratory journal ; 1990, 3 : 922-926.

6)- A Carpentier, G Lemaire, L Robert, S Carpentier, C Dubost ; Biological factors affecting long- term results of valvular heterografts ; Journal of thoracic and cardiovascular surgery ; 1969, 58(4) : 467- 483.

7)- Index Merck, 12ème édition, 1999.

8)- The Aldrich library of infrared spectra ***auteur*** C. J Pouchert ***éditeur*** Milwaukee , Wis. : Aldrich Chemical 1981 ***édition*** 3rd ed., 2nd printing

9)- The Aldrich library of NMR : [nuclear magnetic resonance] spectra ***auteur*** C. J Pouchert ***éditeur*** Milwaukee Wis. : Aldrich Chemical , 1983 ***édition*** 2nd ed

10)- L Abas, M Guppy ; Acetate : A contaminant in hepes buffer ; Analytical biochemistry ; 1995, 229 : 139- 140.

11)- Catalogue Merck réactifs et produits chimique, 1998- 1999.

12)- T.R Theodore, R.L Van Zandt, R.H Carpenter ; Preliminary evaluation of a fixed dose of zwitterionic piperazine (TVZ-7) in clinical cancer ; Cancer biotherapeutic radiopharmacy ; 1997, 12(3) : 345-349.

13)- http://www.inpi.fr.

14)- J Kane, R.L Macdonald, J Zhang, B Sima ; Hepes inhibits contractile responses of canine basilar artery ; Neurological research ; 1997, 19, october : 527-533.

15)- Dresel ; Negative cardiac inotropic effects of calcium ion and N- 2- hydroxyethylpiperazine- N'- 2- ethansulfonic acid (HEPES) buffer at normal and low sodium concentration ; Canadian journal of physiology and pharmacology ; 1974, 52(5) : 1025- 1029.

16)- J.W Hanrahan, J.A Tabcharani ; Inhibition of an outwardly rectifying anion channel by HEPES and related buffers ; Journal of membrane biology ; 1990, 116 : 65-77.

17)- Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, P Kamoun, Coll Médecine-sciences, Ed Flammarion.

18)- T.R Theodore, R.L Van Zandt, R.H Carpenter ; Pilot ascending dose tolerance study of parenterally administered 4- (2- hydroxyethyl)- 1- piperazine ethane sulfonic acid (TVZ- 7) in dogs ; Cancer biotherapeutic radiopharmacy :1997, 12(3) : 351-353.

19)- http://www.dojindo.com

20)- Catalogue Merck 1998- 1999.

21)- http://www.sigma-aldrich.com

22)- M.R knowles, J.L Carson, A.M Collier, J.T Gatzy, R.C Boucher ; Measurement of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo ; American revue of respiratory diseases ; 1981, 124 : 484-490.

23)- La biochimie ***auteur*** L Stryer, S Weinman, P Kamoun ***éditeur*** Paris : Flammarion médecine-sciences , 1992 ***édition*** 3e éd

24)- M.M Reddy, R.R Kopito, P.M Quinton ; Cytosolic pH regulates G_{cl} through control phosphorylation states of CFTR ; American journal of physiology ; 1998, (Cell physiology. 44) : C1040-C1047.

25)- Pharmacopée européenne 3ème édition, 1997.

26)- J.C Chachques, B Vasseur, P Perier, J Balansa, S Chauvaud, A Carpentier ; A rapid method to stabilize biological materials for cardiovascular surgery ; Annals New York academy of sciences.

27)- R.M Anthony, F.J Schoen ; Alkaline phosphatase activity of glutaraldehyde- treated bovine pericardium used in bioprosthetic cardiac valves ; Circulation research ; 1998, 63 : 844- 848.

28)- British Pharmacopoeia 1993 ***éditeur*** London : Her Majesty's Stationery Office , 1993-1997

29)- The United States Pharmacopeia, the National Formulary, édition 2000.